

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/068474 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/71**, A61K 38/17 (74) **Anwalt: KADOR & PARTNER**; Corneliustrasse 15, 80469 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02111 (81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Februar 2002 (27.02.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 01104943.4 28. Februar 2001 (28.02.2001) EP
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)**: **BIO LIFE SCIENCE FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGSGES.M.B.H.** [AT/AT]; Rabenstein 1, A-1010 Wien (AT).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US)**: **ZIELINSKI, Christoph** [AT/AT]; Dr. Heinrich Maierstrasse 20, A-1180 Wien (AT). **SCHEINER, Otto** [AT/AT]; Petersbachgasse 12b, A-2380 Perchtoldsdorf (AT). **JENSEN-JAROLIM, Erika** [AT/AT]; Arbeiterstrandbadstrasse 38, A-1210 Wien (AT). **BREITENEDER, Heimo** [AT/AT]; Kandlgasse 9/23, A-1070 Wien (AT).
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** VACCINE AGAINST CANCER DISEASES THAT ARE ASSOCIATED WITH THE HER-2/NEU ONCOGENE

(54) **Bezeichnung:** VAKZINE GEGEN KREBSERKRANKUNGEN, DIE MIT DEM HER-2/NEU ONKOGEN ASSOZIIERT SIND

(57) **Abstract:** The invention relates to a vaccine against cancer diseases that are associated with the HER-2/neu oncogene. Said vaccine comprises at least one peptide having a length of 9 to 25 amino acids and a sequence that occurs in the extracellular part of the HER-2/neu protein or functional variants thereof, that is functional peptides or nucleic acid sequences encoding said peptides or mimotopes of the peptides. In an especially preferred embodiment, the vaccine contains a peptide having the sequence CRVLQGL-PREYVNARHC and/or YMPIWKFPDEEGAC.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vakzine gegen Krebserkrankungen, die mit dem HER-2/neu Onkogen assoziiert sind. Die Vakzine enthält wenigstens ein Peptid mit einer Länge von 9 bis 25 Aminosäuren und einer Sequenz, wie sie im extrazellulären Teil des HER-2/neu-Proteins auftritt oder funktionelle Varianten davon, d.h. gleichwirkende Peptide oder für diese Peptide codierende Nukleinsäuresequenzen oder Mimotope der Peptide. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die Vakzine ein Peptid der Sequenz CRVLQGLPREYVNARHC und/oder YMPIWKFPDEEGAC.



WO 02/068474 A1

Vakzine gegen Krebserkrankungen, die mit dem HER-2/neu Onkogen assoziiert sind

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vakzine gegen Krebserkrankungen, die mit dem HER-2/neu Onkogen assoziiert sind, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

In den letzten Jahren ist in den westlichen Industrienationen ein stetiges Anwachsen der Krebserkrankungen festzustellen, die damit eine der hauptsächlichen Todesursachen darstellen. Beispielsweise ist Brustkrebs die am weitesten verbreitete Krebsart bei Frauen, von dem etwa 10% aller Frauen in den westlichen Industrienationen betroffen sind.

Bisher bekannte Verfahren zur Therapie von Krebserkrankungen zielen vor allen Dingen auf eine frühe Erkennung der Erkrankung und auf operative Methoden bzw. eine möglichst selektive Abtötung der Tumorzellen durch Chemo- oder Radiotherapie ab. Diese Verfahren weisen die Nachteile auf, daß zum einen eine wirkungsvolle Prophylaxe gegen die Entstehung der Krebserkrankungen nicht möglich ist und daß zum anderen die Behandlung mit ganz erheblichen Nebenwirkungen für die Patienten verbunden ist.

Es ist weiterhin bekannt, daß es bei einer Vielzahl von Krebsarten wie beispielsweise Brust,- Eierstock,- Darm,- Lungen- und Prostatakrebs zu einer Überexpression des HER-2/neu-Proteins (auch als p185 oder c-erbB2 bezeichnet) als Proteinprodukt des HER-2/neu Onkogens kommt. Das HER-2/neu-Protein ist nicht nur mit dem malignen Phenotyp der Krebsart eng verbunden, sondern kann auch mit der Aggressivität der Krebsart verbunden sein. Das HER-2/neu-Protein ist ein Transmembranprotein mit einer relativen molekularen Masse von 185 kd und weist eine Länge von etwa 1255 Aminosäuren auf. Die Aminosäuresequenz des HER-2/neu-Proteins, sowie die Nukleinsäuresequenz einer dafür kodierenden DNA-Sequenz sind in US 5,869,445 wiedergegeben. Auf den Offenbarungsgehalt dieser Druckschrift wird hiermit Bezug genommen. Der extrazelluläre Teil

des HER-2/neu-Proteins umfaßt die Peptidsequenz von Aminosäure 1 bis Aminosäure 675.

In US 5,869,445 wird ein Verfahren zur Stimulation einer Immunantwort auf das HER-2/neu-Protein offenbart, in dem ein Polypeptid der Sequenz von Aminosäure 676-1255 des HER-2/neu-Proteins verabreicht wird.

Es ist demgemäß Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Vakzine gegen Krebserkrankungen, in denen es zu einer Überexpression des HER-2/neu-Proteins kommt, bereitzustellen, mit deren Hilfe es möglich ist, die Nachteile herkömmlicher Krebsbehandlungsmethoden zu vermeiden, eine wirksame Prophylaxe von solchen Krebserkrankungen zu ermöglichen und Alternativen zu dem aus US 5,869,445 bekannten Verfahren bereitzustellen.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß eine solche Vakzine erhalten werden kann, wenn sie Teilstücke des extrazellulären Teils des HER-2/neu Proteins oder funktionelle Varianten davon als wirksame Bestandteile enthält.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Vakzine gegen Krebserkrankungen, die mit dem HER-2/neu Onkogen assoziiert sind, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie wenigstens ein Peptid mit einer Länge von 9 bis 25 Aminosäuren und einer Sequenz, wie sie im extrazellulären Teil des HER-2/neu-Proteins auftritt, oder funktionelle Varianten davon enthält.

Mit der erfindungsgemäßen Vakzine ist eine aktive Immunisierung gegen Krebserkrankungen möglich, die mit dem HER-2/neu-Onkogen assoziiert sind. Somit kann eine Prophylaxe gegen diese Krebserkrankungen erhalten werden. Darüber hinaus kann die erfindungsgemäße Vakzine auch zur Therapie einer bereits bestehenden Krebserkrankung oder begleitend zu herkömmlichen Krebsbehandlungen eingesetzt werden. Durch die Anwendung der erfindungsgemäßen Vakzine können die oben beschriebenen erheblichen Nachteile herkömmlicher Krebsbehandlungsmethoden ganz oder teilweise vermieden werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Vakzine wenigstens ein Peptid mit einer Länge von 10 bis 20 Aminosäuren und einer Sequenz, wie sie im extra-

zellulären Teil des HER-2/neu-Proteins auftritt, oder funktionelle Varianten davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Vakzine wenigstens ein Peptid mit einer der Sequenzen von Aminosäure 544 bis 560 und/oder von Aminosäure 610 bis 623 des extrazellulären Anteils des HER-2/neu-Proteins oder funktionelle Varianten davon.

Die Sequenz des Peptids mit den Sequenzen von Aminosäure 544 bis 560 des extrazellulären Anteils des HER-2/neu-Proteins ist: CRVLQGLPREYVNARHC (Sequenz 1). Die Sequenz des Peptids mit den Sequenzen von Aminosäure 610 bis 623 des extrazellulären Anteils des HER-2/neu-Proteins ist: YMPIWKFPDEEGAC (Sequenz 2). Die Sequenzen sind im Sequenzprotokoll als Sequenznummer 1 bzw. Sequenznummer 2 wiedergegeben.

Fig. 1 zeigt einen Western-Blot der Immunpräzipitation eines Lysates von HER-2/neu überexprimierenden SKBR-3 Zellen mit Sera von Mäusen, die mit der erfindungsgemäßen Vakzine behandelt wurden, und unbehandelten Mäusen zum Nachweis der Immunantwort nach Verabreichung der Vakzine.

Fig. 2 zeigt ELISA-Daten der Sera von Mäusen, die mit der erfindungsgemäßen Vakzine behandelt wurden, und unbehandelten Mäusen zum Nachweis der Immunantwort nach Verabreichung der Vakzine.

Unter funktionellen Varianten der Peptide werden alle Stoffe verstanden, die eine Immunantwort basierend auf demselben Wirkmechanismus wie die erwähnten Peptide hervorrufen.

Im Speziellen werden darunter zum einen alle Peptide verstanden, die funktionelle Varianten der Peptide, wie beispielsweise der Peptide mit den Sequenznummern 1 und 2, darstellen (im folgenden als funktionelle Peptidvarianten bezeichnet). Diese können durch Weglassen einer oder mehrerer Aminosäuren, durch Insertion zusätzlicher Aminosäuren, durch Substitution von Aminosäuren oder anderen Modifikationen erhalten werden, und rufen im wesentlichen dieselbe Immunantwort wie die Peptide selbst, beispielsweise die Peptide der Sequenznummern 1 und 2. hervor. Als Beispiel für die Erzeugung solcher Varianten

ten kann die Substitution einzelner Aminosäuren der Peptide dienen, die konservativ, das heißt durch die Substitution einer Aminosäure mit einer anderen, die ähnliche Eigenschaften aufweist, vorgenommen wird. Solche konservativen Substitutionen sind beispielsweise in US 5,869,445 beschrieben. Die Natur der durch eine solche Substitution erhaltenen Variante bleibt im Vergleich zu den Peptiden, beispielsweise den Peptiden mit den Sequenznummern 1 und 2, im wesentlichen unverändert und somit wird bei Verabreichung einer solchen Variante im wesentlichen dieselbe Immunantwort erhalten.

Des weiteren werden unter funktionellen Varianten auch DNA-oder RNA-Moleküle verstanden, die für die oben erwähnten Peptide, beispielsweise die Peptide mit den Sequenznummern 1 und 2, oder deren funktionellen Peptid-Varianten kodieren (im folgenden als funktionelle Nucleinsäure-Varianten bezeichnet). Diese DNA- oder RNA-Moleküle können dabei auch in viralen Vektoren vorhanden sein. In US 5,869,445 werden eine Anzahl solcher Arten von Varianten sowie deren Herstellung beschrieben, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Des weiteren werden unter funktionellen Varianten auch Mimotope der oben erwähnten Peptide oder deren Peptid-Varianten verstanden (im folgenden als funktionelle Mimotop-Varianten bezeichnet). Diese können beispielsweise mimetische Proteine sein (im folgenden als mimetische-Protein-Varianten bezeichnet, wie sie beispielsweise durch Screening von Phagen-Peptidbibliotheken mit gegen die Peptide oder deren Peptid-Varianten gebildeten Antikörpern aufgefunden werden. Die Vorgehensweise zum Erhalt solcher Mimotope ist beispielsweise aus der europäischen Patentanmeldung EP 100 41 342.0 bekannt, auf deren Offenbarungsgehalt hiermit Bezug genommen wird.

Die erfindungsgemäßen Peptide oder deren funktionelle Varianten können auch mit anderen Peptiden oder Polypeptiden oder mit weiteren chemischen Gruppen wie Glycosylgruppen, Lipiden, Phosphaten, Acetylgruppen oder ähnlichen verknüpft sein, soweit sie deren Wirkung nicht nachteilig beeinflussen.

Bevorzugt enthält die erfindungsgemäße Vakzine jedoch die Peptide, d.h. Teilstücke des extrazellulären Teils des HER-2/neu Proteins, selbst, und weiter be-

vorzugt mindestens eines der oben erwähnten Peptide mit den Sequenznummern 1 und 2 als solches.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Peptid oder dessen funktionelle Variante an einen immunogenen Träger konjugiert. Solche Träger können Makromoleküle aller Art sein. Die Konjugation mit einem Träger hat zur Folge, daß die Immunogenität der Vakzine erhöht wird.

Bevorzugt wird das Peptid oder dessen funktionelle Variante an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) oder Tetanustoxoid (TT) konjugiert.

Die Konjugation der Peptide oder deren Varianten an das Trägermaterial kann auf beliebige Weise erfolgen, beispielsweise auf gentechnologischem oder chemischen Weg, das heißt die Verknüpfung von Träger und funktioneller Gruppe erfolgt durch eine chemische Reaktion. Auf gentechnologischen Wege kann die Koppelung des Proteinträgermoleküls mit dem Peptid oder dessen Variante so hergestellt werden, daß eine für die Gesamtsequenz des Konjugats kodierende DNA- oder RNA-Sequenz in ein Expressionssystem eingebaut wird, von dem dann das Gesamtkonjugat exprimiert wird. Diese Form der Konjugation kann selbstverständlich nur für den Fall angewendet werden, daß auch das Gesamtkonjugat ein Proteinmolekül ist.

Bevorzugterweise werden die Peptide oder deren Varianten auf chemischem Weg mit dem Träger konjugiert. Das heißt, die Verknüpfung von Peptid oder dessen Variante und dem Träger zum Konjugat erfolgt auf chemischem Wege.

Die Peptide oder deren funktionelle Varianten können als Mono-, Di-, Tri- oder Oligomer mit dem Träger konjugiert werden. Solche Konjugationen sind beispielsweise in der Druckschrift von Th. H. Turpen, S. J. Reinl, Y. Charoenvit, S.L. Hoffman, V. Fallarme in Bio/Technology, 1995, Band 13, Seiten 53 bis 57 am Beispiel der Konjugation von Epitopen mit makromolekularen Trägern beschrieben. Auf den Offenbarungsgehalt dieser Druckschrift wird hiermit Bezug genommen. Die beschriebenen Vorgehensweisen lassen sich analog auf die Herstellung der Konjugate für die erfindungsgemäße Vakzine übertragen.

Wird die Konjugation eines di- oder oligomeren Peptidkonjugats auf dem Weg des oben beschriebenen gentechnologischen Verfahrens durchgeführt, so werden die für die Peptide kodierenden DNA- oder RNA-Abschnitte ein- oder mehrmals hintereinandergereiht in die für den Träger kodierende DNA- oder RNA-Sequenz integriert. Dadurch wird die Expression di- oder oligomerer Peptidkonjugate erreicht.

Die Mono- oder Oligomere der Peptide oder deren funktioneller Varianten können sowohl in einfacher als auch in multipler Form an den Träger konjugiert werden, d.h. an einen Träger werden ein oder mehrere Peptidmoleküle oder deren funktionelle Varianten angehängt.

Die erfindungsgemäße Vakzine kann auf verschiedene Arten appliziert werden. Die Verabreichung der die Peptide selbst bzw. deren funktionelle Peptid- oder Mimotop-Varianten enthaltenden Vakzine kann beispielsweise intravenös, subkutan oder auch durch orale Einnahme der Vakzine in Kapsel oder Tablettenform erfolgen. Enthält die erfindungsgemäße Vakzine funktionelle Nucleinsäure-Varianten der Peptide, kann die Verabreichung auch mit Hilfe einer ex-vivo Prozedur erfolgen, die die Entnahme von Zellen aus einem Organismus, das Einbringen der erfindungsgemäßen Vakzine in diese Zellen, und das Wiedereinbringen der behandelten Zellen in den Organismus umfaßt.

Die erfindungsgemäße Vakzine kann in vielfältiger Weise auf gentechnologischem oder chemischem Weg hergestellt werden. Solche Verfahren sind beispielsweise in US 5,869,445 beschrieben.

Ein Beispiel für ein gentechnologisches Herstellungsverfahren ist die Manipulation von Mikroorganismen wie E. coli. Diese werden so manipuliert, daß sie die Peptide als solche oder die Gesamtkonjugate bestehend aus Peptid und daran gekoppelten Träger exprimieren.

Bevorzugterweise werden die Peptide, funktionelle Peptid-Varianten oder mimetische-Peptid-Varianten auf chemischem Wege synthetisch dargestellt. In einer bevorzugten Ausführungsform geschieht dies mit Hilfe der Festphasensynthesemethode. Weiter bevorzugt wird das synthetisch dargestellte Peptid, die funktio-

nelle Peptid-Variante oder mimetische-Peptid-Variante auf chemischem Weg mit einem Träger wie KLH oder TT verknüpft.

Die erfindungsgemäße Vakzine kann zur prophylaktischen oder akuten Behandlung von Menschen und Tieren, die mit dem HER-2/neu Onkogen assoziierte Krebsarten entwickeln können, eingesetzt werden.

Im folgenden wird eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vakzine, ein Verfahren zu deren Herstellung, sowie Methoden zum Nachweis von deren Wirksamkeit an einem Ausführungsbeispiel beschrieben.

Beispiel

Die Peptide mit der Sequenznummer 1 und 2 wurden hergestellt und mit Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) konjugiert.

Die Peptide wurden mit der Festphasensynthese nach der FMOC-Schutzgruppen Strategie synthetisiert. Die Konjugation erfolgte über die Thiofunktion des C-terminalen Cysteins an das maleimidmodifizierte KLH.

Immunisierung

Zum Nachweis der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Vakzine wurden zwei Gruppen zu jeweils fünf Mäusen folgendermaßen behandelt:

Der ersten Gruppe (Versuchsgruppe) wurden die beiden jeweils an KLH konjugierten Peptide mit den Sequenznummern 1 und 2, sowie Gerbu-Adjuvant verabreicht. Jede Injektion enthielt je 100 µg von jedem Konjugat in einem Volumen von 100µl gemischt mit 100µl Gerbu-Adjuvant, d.h. insgesamt 200 µl Antigenlösung pro Injektion. Die Kontrollmäuse wurden mit 200 µl einer Mischung von 100µl Wasser mit 100µl Gerbu-Adjuvant behandelt. Die Vakzine wurde s.c. in die Kniefalte verabreicht.

Gerbu-Adjuvant ist eine Adjuvansformulierung, die auf N-Acetylglucosaminyl-N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamin basiert, mit Dimethyldioctadecylammoniumchlorid und einem Zink-L-Prolinkomplex als Synergisten. Dieses Adjuvans kann von der Firma Gerbu-Biotechnik GmbH, Gaiberg, Deutschland bezogen werden.

Immunisierungsschema

Nach dem Priming erfolgten 3 Booster im Abstand je 3 Wochen. Sieben Tage nach dem letzten Booster wurden die Tiere getötet. Blut, Milz, Leber, Lunge und Nieren wurden entnommen.

Als Methoden zum Nachweis der Induktion einer Peptid- und HER-2/neu spezifischen Immunantwort in Mäusen wurden die folgenden drei verwendet:

1. Nachweis einer T-Zell Aktivierung in einem Proliferationsassay

Dabei wurden zunächst die aus den immunisierten Mäusen gewonnenen Milzzellen mit den zur Immunisierung verwendeten Peptiden der Sequenznummern 1 und 2 stimuliert. Als Maß für die Proliferation gilt der Einbau an ^3H -Thymidin, der quantifiziert werden kann. Es werden die Counts pro Minute (cpm) ermittelt. Als Stimulationsindex (SI) bezeichnet man den Quotient aus cpm (mit dem jeweiligen Peptid stimulierter Zellen) / cpm (unstimulierter Zellen). In 96-Well Platten wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung fünf Tage lang mit den beiden Polypeptiden, mit der Sequenznummer 1 oder 2, in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/mL}$ inkubiert. Nach dieser Zeit wurde ^3H -Thymidin zugegeben und nach 18 Stunden Inkubation die eingebaute Aktivität gemessen.

Die oben beschriebene Prozedur erbrachte folgendes Ergebnis:

Der Stimulationsindex in der immunisierten Gruppe (Versuchsgruppe) variierte von 1.0 bis 1.6 für das Peptid der Sequenz 1 und von 1.5 bis 2.0 für Peptid der Sequenz 2.

Der Stimulationsindex in der Kontrollgruppe hatte in allen Fällen den Wert 1.0, d.h. es wurde keine Proliferation der Zellen festgestellt.

2. Nachweis HER-2/neu spezifischer Antikörper durch Immunpräzipitation

Da es kein kommerziell erhältliches HER-2/neu Protein gibt, wurde ein Zellysate von SKBR-3-Mammakarzinomzellen, die HER-2/neu überexprimieren, verwendet. Die Mäusera wurden mit dem Zellysate inkubiert. Bei Vorhandensein spezifischer Antikörper im Serum wird das HER-2/neu aus dem Zellysate präzipitiert. Der gebildete Immunkomplex, kann der mit Hilfe von Protein A+G-Agarose (bindet Antikörper) isoliert werden. Diese Komplexe wurden dann durch eine 6%ige Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Das präzipitierte HER-2/neu wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen anti-HER-2/neu Antikörpers (Zymed) detektiert. Dabei wird die entsprechende Bande auf der Membran durch eine Färbung visualisiert. Die hier beschriebene Methode dient als ein qualitativer Nachweis.

Die Analyse der Seren ergab folgendes Ergebnis:

In Fig. 1 ist die Immunpräzipitation des Lysates der SKBR-3 Zellen mit Mäusera der Versuchs- und der Kontrollgruppe gezeigt. In allen Seren der Versuchsgruppe wurden die spezifischen anti HER-2/neu Antikörper nachgewiesen. Alle Seren der Kontrollgruppe zeigten eindeutig ein negatives Ergebnis.

3. Nachweis HER-2/neu spezifischer Antikörper mittels ELISA

Dabei wurden zunächst die Vertiefungen einer 96-Well ELISA-Platte mit Herceptin (anti-HER-2/neu-Antikörper von Genentech Inc.) beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 2% Milch blockiert. Die Wells wurden dann mit den Membranfraktionen aus SKBR-3 Zellen, die das HER-2/neu-Protein überexprimieren, inkubiert. Um den unspezifischen Hintergrund zu quantifizieren, wurden Kontrollwells mit Membranfraktionen von HTB132-Zellen, die kein HER-2/neu-Protein exprimieren, inkubiert. In beiden Fällen wurden nachfolgend unspezifische Bindungsstellen mit 2% Milch abgesättigt (blockiert).

Im nächsten Schritt wurden die Sera der immunisierten Mäuse (Maus 16 bis Maus 20) und die der Kontrollgruppe (Maus 1 bis Maus 5), die vor und nach der Immunisierung gewonnen worden waren, in einer Verdünnung von 1:100 in die Wells pipettiert. Für jedes Serum wurden 2 Wells mit SKBR-3-Membranen und 2 Wells mit HTB 132-Membranen verwendet. Gibt es im Serum spezifische Antikörper gegen das HER-2/neu-Protein, so werden sie an das Antigen binden. Diese Antikörper können dann mit Horseradish-Peroxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörpern detektiert werden. HRP geht mit dem Substrat eine Farbreaktion ein. Das Ergebnis dieser Farbreaktion kann mit dem Photometer gemessen werden. Dabei wird die Absorption bei 450 nm bestimmt und gegen den Hintergrund von 650 nm korrigiert (OD Werte). Als Ergebnis wird für jedes Serum die Differenz aus dem OD-Wert der beiden mit SKBR-3-Lysat inkubierten Wells minus dem OD-Wert der beiden mit HTB132-Lysat inkubierten Wells gewertet.

Diese Methode ermöglicht einen Vergleich des Antikörper-Titers in Seren.

Es wurden Seren aller Mäuse vor und nach der Vakzinierung ausgewertet. In 4 von 5 Mäusen der Versuchsgruppe ließ sich ein deutlicher Anstieg der OD-Werte nach der Immunisierung feststellen. Die erhaltenen OD-Werte der Kontrollgruppe zeigten keine Veränderung des Antikörper-Titers.

Histopathologischer Befund

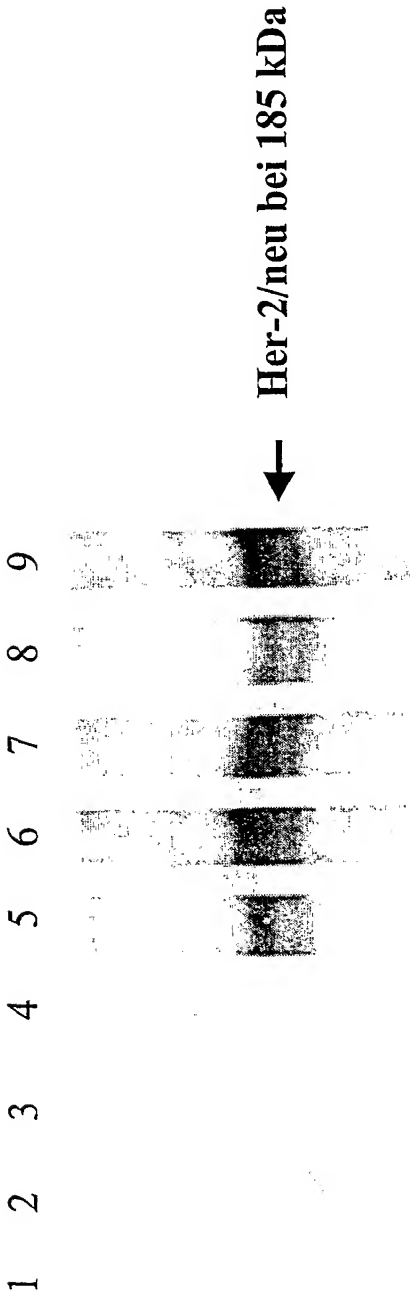
Lungen, Leber und Nieren wurden histopathologisch hinsichtlich Autoimmunreaktionen untersucht. In allen Fällen wurden Organe o.B. bewertet.

Ansprüche

1. Vakzine gegen Krebserkrankungen, die mit dem HER-2/neu Onkogen assoziiert sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens ein Peptid mit einer Länge von 9 bis 25 Aminosäuren und einer Sequenz, wie sie im extrazellulären Teil des HER-2/neu-Proteins auftritt, oder funktionelle Varianten davon enthält.
2. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens ein Peptid mit einer Länge von 10 bis 20 Aminosäuren und einer Sequenz, wie sie im extrazellulären Teil des HER-2/neu-Proteins auftritt, oder funktionelle Varianten davon enthält.
3. Vakzine nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid mit einer der Sequenzen von Aminosäure 544 bis 560 und/oder von Aminosäure 610 bis 623 des extrazellulären Anteils des HER-2/neu-Proteins oder funktionelle Varianten davon enthält.
4. Vakzine nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid oder dessen funktionelle Variante an einem immunogenen Träger konjugiert ist.
5. Vakzine nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) oder Tetanustoxoid (TT) verwendet wird.
6. Vakzine nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Konjugation chemisch erfolgt ist.
7. Vakzine nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid oder dessen funktionelle Variante als Monomer, Dimer, Trimer oder Oligomer an den Träger konjugiert ist.

8. Vakzine nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid oder dessen funktionelle Variante einfach oder mehrfach an den Träger konjugiert ist.

Western-Blot: Immunpräzipitation eines Lysates der SKBR-3 Zellen mit
Mäuse-Sera



Lane 1: Pufferkontrolle

Lane 2 - 4: Kontrollmäuse

Lane 5 - 9: mit Sequenz 1 + Sequenz 2 immunisierte Mäuse

Fig. 1

ELISA Daten der Maussera der Kontrollgruppe und der immunisierten Mäuse

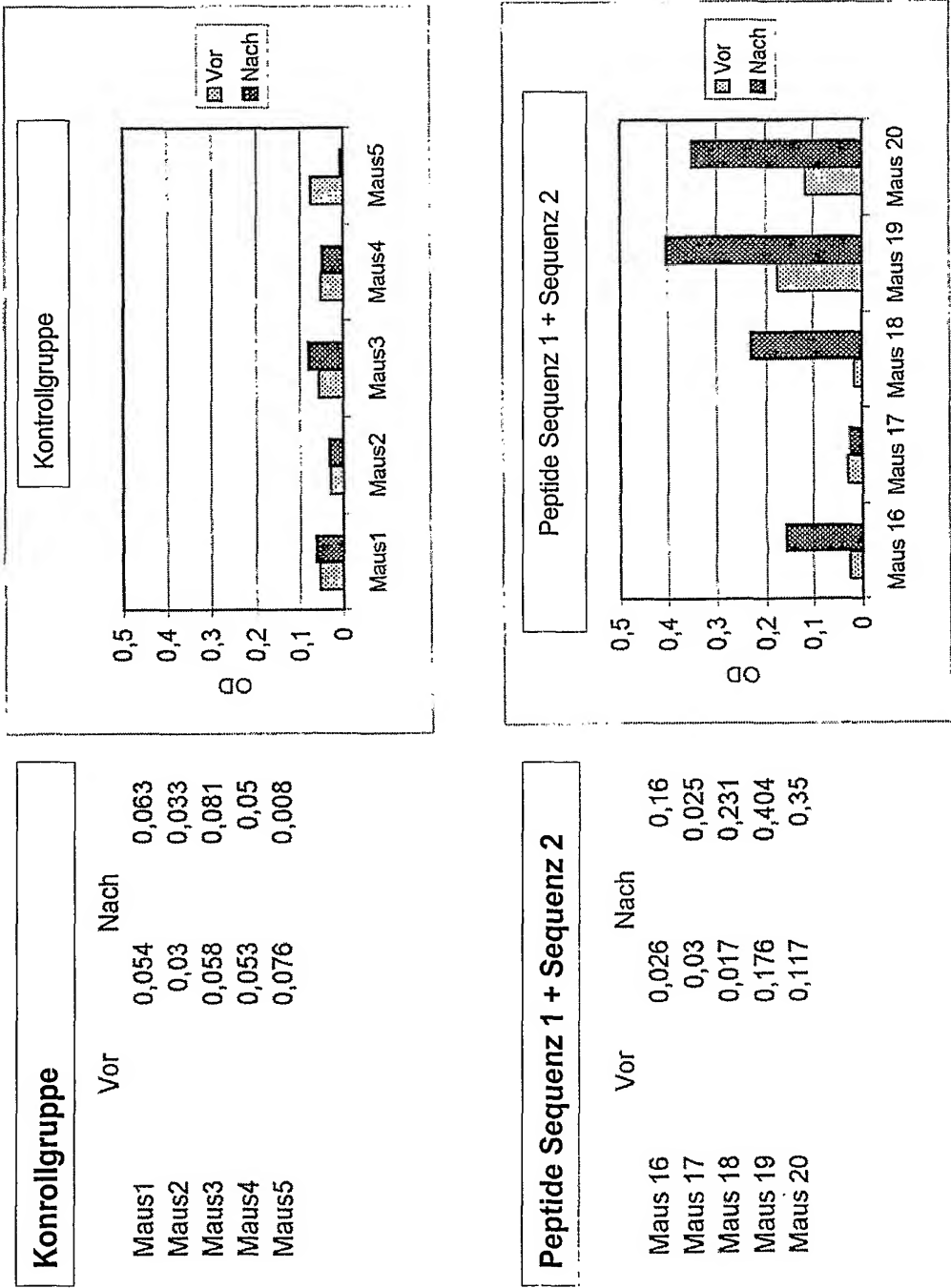


Fig. 2

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bio Life Science Forschungs- und Entwicklungsges.

<120> Vakzine gegen Krebserkrankungen, die mit dem HER-2/neu
Onkogen assoziiert sind

<130> K 36897

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His
1 5 10 15

Cys

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/02111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/71 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 05 117165 A (MASAKAZU UEDA; OTHERS: 01) 14 May 1993 (1993-05-14) table 1 page 4, line 33	1-8
X	US 5 801 005 A (DISIS MARY L ET AL) 1 September 1998 (1998-09-01) * SEQ ID No:38 * column 14, paragraph 2	1-8
X	WO 96 18409 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; SHERMAN LINDA A (US)) 20 June 1996 (1996-06-20) * SEQ ID NO:13 * page 48, line 3 - line 4	1-8
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 June 2002

Date of mailing of the international search report

04/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mata Vicente, T.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/02111

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 08636 A (UNIV OHIO) 8 February 2001 (2001-02-08) claim 1 ---	1-8
X	WO 99 57981 A (SLOAN KETTERING INST CANCER ;ZELENETZ ANDREW D (US); ROBERTS WENDY) 18 November 1999 (1999-11-18) page 7, line 4 - line 8 -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/02111

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 05117165	A	14-05-1993	NONE	
US 5801005	A	01-09-1998	AU 708237 B2	29-07-1999
			AU 5522296 A	16-10-1996
			BR 9607889 A	10-08-1999
			CA 2216601 A1	03-10-1996
			CN 1183117 A	27-05-1998
			CZ 9703096 A3	14-01-1998
			EP 0817846 A1	14-01-1998
			HU 9801826 A2	30-11-1998
			JP 11502710 T	09-03-1999
			NO 974502 A	27-11-1997
			NZ 306616 A	30-03-2001
			WO 9630514 A1	03-10-1996
			US 2002055614 A1	09-05-2002
			US 6075122 A	13-06-2000
			US 5726023 A	10-03-1998
			US 5876712 A	02-03-1999
			US 5846538 A	08-12-1998
			US 5869445 A	09-02-1999
WO 9618409	A	20-06-1996	AU 712441 B2	04-11-1999
			AU 4600796 A	03-07-1996
			CA 2207736 A1	20-06-1996
			EP 0793501 A1	10-09-1997
			FI 972514 A	12-08-1997
			JP 10510988 T	27-10-1998
			NO 972729 A	13-08-1997
			WO 9618409 A1	20-06-1996
WO 0108636	A	08-02-2001	AU 6620300 A	19-02-2001
			WO 0108636 A2	08-02-2001
WO 9957981	A	18-11-1999	EP 1075184 A1	14-02-2001
			JP 2002514573 T	21-05-2002
			WO 9957981 A1	18-11-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/02111

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/71 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JP 05 117165 A (MASAKAZU UEDA;OTHERS: 01) 14. Mai 1993 (1993-05-14) Tabelle 1 Seite 4, Zeile 33 ---	1-8
X	US 5 801 005 A (DISIS MARY L ET AL) 1. September 1998 (1998-09-01) * SEQ ID No:38 * Spalte 14, Absatz 2 ---	1-8
X	WO 96 18409 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;SHERMAN LINDA A (US)) 20. Juni 1996 (1996-06-20) * SEQ ID NO:13 * Seite 48, Zeile 3 - Zeile 4 --- -/--	1-8



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* & * Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Juni 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mata Vicente, T.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/02111

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 08636 A (UNIV OHIO) 8. Februar 2001 (2001-02-08) Anspruch 1 ----	1-8
X	WO 99 57981 A (SLOAN KETTERING INST CANCER ;ZELENETZ ANDREW D (US); ROBERTS WENDY) 18. November 1999 (1999-11-18) Seite 7, Zeile 4 - Zeile 8 -----	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/02111

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 05117165 A	14-05-1993	KEINE	
US 5801005 A	01-09-1998	AU 708237 B2	29-07-1999
		AU 5522296 A	16-10-1996
		BR 9607889 A	10-08-1999
		CA 2216601 A1	03-10-1996
		CN 1183117 A	27-05-1998
		CZ 9703096 A3	14-01-1998
		EP 0817846 A1	14-01-1998
		HU 9801826 A2	30-11-1998
		JP 11502710 T	09-03-1999
		NO 974502 A	27-11-1997
		NZ 306616 A	30-03-2001
		WO 9630514 A1	03-10-1996
		US 2002055614 A1	09-05-2002
		US 6075122 A	13-06-2000
		US 5726023 A	10-03-1998
		US 5876712 A	02-03-1999
		US 5846538 A	08-12-1998
		US 5869445 A	09-02-1999
WO 9618409 A	20-06-1996	AU 712441 B2	04-11-1999
		AU 4600796 A	03-07-1996
		CA 2207736 A1	20-06-1996
		EP 0793501 A1	10-09-1997
		FI 972514 A	12-08-1997
		JP 10510988 T	27-10-1998
		NO 972729 A	13-08-1997
		WO 9618409 A1	20-06-1996
WO 0108636 A	08-02-2001	AU 6620300 A	19-02-2001
		WO 0108636 A2	08-02-2001
WO 9957981 A	18-11-1999	EP 1075184 A1	14-02-2001
		JP 2002514573 T	21-05-2002
		WO 9957981 A1	18-11-1999